

A mikróbasejt szaporodását befolyásoló tényezők kinetikai tanulmányozása

VAS KÁROLY

Konzerv-, Hús- és Hűtőipari Kutató Intézet, Budapest

Bevezetés

A mikrobákat a külső környezet erősen befolyásolja élettevékenységükben. Túlzott hőbevitel vagy hőelvonás, sugárzások, vegyszerek, hidrogénionkoncentráció-, redoxpotenciálváltozás stb. gyakran bénítják szaporodásukat, sőt nem ritkán egyenesen megölik a sejteket. Bizonyos tényezők, ellenkezőleg, gyorsítják a növekedést és szaporodást.

A mikroorganizmusokat gátló vagy stimuláló hatás mérése sokféleképpen történhet. A régebbi eljárások általában egy meghatározott időtartamú tenyésztés után állapítják meg a szaporodás tényét, gyorsabbodását vagy lassulását, kvantitatív viszonyait a sejtszám- illetve sejttömeg-koncentráció mérésére szolgáló eljárások valamelyikével. Az újabb irány ezen a téren a fenti »sztatikus« vizsgálati metodika helyett »kinetikai« nézőpontból tanulmányozza a kérdést.

A mikrobák szaporodásának ma már eléggé ismert kinetikai törvényszerűségei vannak [Monod (5)]. Különösen alaposan vizsgálták a baktériumok (és élesztők) esetén ezeket a szabályszerűségeket. Megállapították, hogy a szaporodás több szakaszból áll (1. ábra). Először az úgynevezett késlekedési fázis (I) során a tápoldatra beoltott sejtek száma változatlan marad, ilyenkor a mikroorganizmus »hozzászokik« az új környezethez, rendkívül bonyolult belső folyamatok, enzimszermódosulások, közbülső anyagcseretermékek kellő koncentrációban való kiképzése stb. nyomán alkalmassá válik a közeg a felhasználásra. Gyakran sejtnövekedés (méretbeli) is jön létre. Ezután a gyorsuló szaporodás fázisa (II) következik, melynek során a vegetatív szaporodás (sejtosztódással vagy sarjadzással) megindul és egyre gyorsabb lesz. Ez aztán a maximális illetőleg egyenletes szaporodási sebességű szakaszban, az úgynevezett logaritmusos fázisban (III) folytatódik. Itt a szaporodás az idő függvényében exponenciális jellegű és egy elsőrendű kémiai reakció kinetikai szabályaival írható le:

$$n = n_0 \cdot e^{k \cdot t}, \text{ illetve } \ln \frac{n}{n_0} = k \cdot t$$

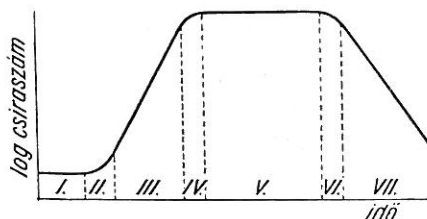
ahol n_0 az élő sejtek kezdeti koncentrációja, n ugyanaz az érték a t időpontban. k a szaporodási sebességi állandó.

Ezek után a lassuló szaporodási szakasz (IV), majd a megállapodás (stagnálás) fázisa (V) következik. A tenyészet csíraszám itt éri el maximumát (G). Idő multával aztán a sejtek pusztulása megindul (VI) és a csíraszám rendszerint exponenciálisan csökken (VII).

A vegyszerek illetőleg egyéb gátló hatások a baktériumok szaporodásának ezt a menetet megzavarják, ami a késlekedési szakasz időtartamának (L) megnyúlásában, a szaporodás lassulásában, vagyis a k -érték csökkenésében és a maximális csíraszám (G) kisebbedésében nyilvánulhat meg [Hinschelwood (4)]. Stimuláló anyagok ezzel ellentétes hatásokat váltanak ki.

A fenti fázisok közül elsősorban vagy a késlekedési vagy a logaritmusos szakaszra gyakorolt hatást vizsgálták eddig.

A késlekedési fázis gátlás következtében való megnyúlásán alapszik jórészt az a régi eljárás is, amelynek során a zavarosodás vagy telepkepződés megindulásáig eltelt időt figyelték meg. Ez az időtartam ugyanis gyakran párhuzamosan változik a késlekedési fázissal (ha tudniillik a gátló



1. ábra.

A baktériumok és élesztők szaporodásának főbb szakaszai

hatás a szaporodási sebességet nem változtatta meg egyidejűleg). Az L értékét a szaporodási görbéből grafikusán szokták megállapítani.

A logaritmusos szaporodási sebesség változását szintén a szaporodási görbéből határozzák meg. Újabban ezt igyekeztek felhasználni penicillin, sztreptomycin és egyéb gátló anyagok meghatározására Osgood és Gamble (7). Eljárásukban a vizsgálati és a kontrol tenyészet logaritmusos szaporodási görbéi egyenes szakaszának hajlásszögei által bezárt szög tangensével hozzák (egyenes) arányba az antibiotikumkoncentrációt.

A szaporodási sebesség csökkenésével jellemezték különböző vegyszerek hatását penészekre és baktériumokra Vincent és munkatársai is (1, 2, 3, 6). A kémiai szerkezet és a fungi-, illetőleg bakteriosztatikus hatás közötti összefüggést vizsgálva, minden kipróbált vegyszerre nézve megállapították, azt a koncentrációt, melynél a szaporodási sebességi állandó értéke a kontrollénak felelt meg és ennek a millimolban kifejezett koncentrációnak negatív logaritmusát ($\log I_{50}$) adták meg.

Saját kísérletek

Kísérleteinkkel az volt a célunk, hogy első lépésben a gátló hatásnak a szaporodás fázisaiban való jelentkezését megismerjük. Tanulmányoztuk a késlekedési szakasz meghosszabbodását, a szaporodási sebesség csökkenését és a maximális populáció értékének változását.

Az eljárás alapelvei

Eljárásunk vázlata a következő. Ismert élő csíraszámú, különböző vegyszertöménységű tápoldatokban fotométerrel mérjük az idő függvényében a mikrobák szaporodását. A szaporodási görbékéből a késlekedési fázis időtartamát (L) meghatározzuk szerkesztéssel és a vegyszerkoncentráció függvényében ábrázoljuk azt. Grafikusan meghatározzuk a kapott szaporodási görbékéből a generációs időket (illetőleg ezekből a szaporodási sebességi állandókat, k). Kiszámítjuk azt a koncentrációt, mely pontosan 50%-kal csökkentette volna a k értékét a kontrolléhoz képest (m). Megállapítjuk végül a hosszabb idő múltán beállt maximális csíraszámot (G).

Metodikai szempontból a k -ra közepes hatású dózis (m) mérése jelentett komolyabb problémát. Vincent munkájáról csak kísérleteink befejezése után értesültünk, és így tőlük függetlenül jutottunk arra a gondolatra, hogy a gátló hatást a szaporodási sebesség felére való lecsökkentéséhez szükséges koncentrációval jellemezzük. Ez az adat többet mond, mint a »teljes« gátlást okozó töménység értéke. A közepes hatású vegyszerkoncentráció kiszámításának metodikájával — melyre egyébként Vincent és munkatársai számunkra hozzáférhető helyen nem térnek ki — a k -értékek szórása miatt kellett külön is foglalkoznunk.

Penészeknél a szaporodást a szilárd tápláló közeg felületén tapasztalható telepátmérő-növekedésből tanulmányoztuk.

A következőkben először a sejtszaporodás sebességének mérését, majd ebből a közepes hatású dózis kiszámítását, továbbá a késlekedési fázis megváltozásának mérését és a maximális csíraszám meghatározását ismertetjük.

Ezután a módszer alkalmazásának néhány esetére térünk rá néhány vegyszer összehasonlító vizsgálatával kapcsolatban. A vegyszereket *Sach. cerevisiae* var. *ellipsoideus*-on *Torulopsis utilis* var. *maior*-on, *Bac. cereus*-on és *Asp. foetidus*-on próbáltuk ki. A szaporodási görbék adataiból a szaporodási sebességet, a késlekedési szakaszt és a maximális csíraszámot számítottuk ki.

Az eredmények értékelése során vizsgáltuk, hogy az előbbi esetekben a szaporodási sebességi állandó miként függ össze az összes szaporulattal és a késlekedési szakasz időtartamával. Megpróbáltuk aztán a szaporodási sebességre gyakorolt hatásnak a közepes hatású dózis kiszámításán túlmenő, közelebbi jellemzését adni. A szaporodás kinetikai vizsgálatából a gátló hatás mechanizmusára igyekeztünk következtetni. Végül az adatokat vegyszerek szerint csoportosítva és ezek disszociációs állandóit figyelembe véve, értékeltük az egyes vegyületeket.

A munka egyes lépéseiről a következőkben számolunk be.

A sejtszaporodás sebességének mérése

Élesztők, baktériumok

A sejttöménység (az egységnyi térfogatban levő sejtek száma illetőleg mennyisége) meghatározása Pulfrich-fotométerrel (Stufenphotometer) történt, 665 mμ-os (S 66) szűrővel, egy más helyen [Vas (14)] ismertetett turbidimetriás eljárással.

Félig logaritmikus koordináta-rendszerben az ordinátára logaritmikus léptékben a nyert csíraszámot (-tömeget) a lineáris léptékben az abszcisszára felvitt idő függvényében felrajzoltuk. A kapott szaporodási görbe egyenes (exponenciális) szakaszának hajlásszögéből a generációs időt ($T =$ a csíraszám megkettőződéséhez szükséges órák száma) kiszámítottuk. Ebből az exponenciális szaporodás sebessége az elsőrendű kémiai reakciókra jellemző kinetikai törvényszerűségek felhasználásával kiszámítható. Ugyanis

$$n = n_0 \cdot e^{kt} \quad \text{lévén,}$$

$$e^{kt} = \frac{n}{n_0}, \quad \text{illetőleg} \quad k \cdot t = \ln \frac{n}{n_0}$$

$$k = \frac{\ln \frac{n}{n_0}}{t}$$

Ha $n = 2 n_0$, akkor

$$k = \frac{\ln 2}{T} \quad \text{vagyis} \quad k = \frac{0,693}{T} (\text{óra}^{-1})$$

Penészek

A szaporodás sebességének mérése penészeknél a tápágár felületén való telep-növekedés sebességének megállapításával történt. A legtöbb penésznél ugyanis a petricsészében levő ágarlemez közepére helyezett spóraszuszpenzió-cseppből kifejlődő kör alakú penésztelep átmérője — a kezdeti késlekedési, majd gyorsuló szakasztól eltekintve — az idő függvényében lineárisan növekszik: azonos időtartamok alatt azonos számú mm-rel lesz nagyobb a telepátmérő [Tomkins (13)]. A jelenséget mi úgy értelmezzük, hogy az a lineáris növekedési szakaszban formailag egy nulla-rendű kémiai reakció kinetikai törvényszerűségeivel írható le, melynél a reakciósebesség független a kezdeti koncentrációtól (csíraszámától, itt telepátmérőtől).

$$D = k \cdot t$$

ahol D a telepátmérő t időpontban; k a szaporodási sebességi állandó. Következésképpen, a lineáris fázisban:

$$k = \frac{D}{t}$$

A telepátmérő növekedését a petricsészében, átlátszó tápágáron középtűt elhelyezett egy kacsnyi penészspóraszuszpenzióból fejlődő telep időközönkénti, átlátszó

milliméterskálával kívülről, alulról történő mérésével tanulmányoztuk. A telep széleinek legfinomabb, szemmel még látható növekedését is figyelembe vettük. A tapasztalat az, hogy a telep közepének az időkfolyamán történő elváltozásai, fejlődése (a penészbefonat vastagodása, sporaképződés stb.) nem befolyásolja a szélek szaporodási ütemét.

A közepes hatású dózis megállapítása

A különböző vegyszerkoncentrációknál észlelt szaporodási sebességi állandókból azt a töménységet, melyeknél k értéke a kontrollénak 50%-a lett volna, a mozgó átlagok módszerével az alábbi módon számítottuk ki.

A kísérletek tervezésénél ügyeltünk arra, hogy az egymásutáni vegyszerkoncentrációk egy állandó szorzóban (hígítási faktor, R) különbözzenek egymástól, tehát, hogy a koncentrációk geometriai haladványt alkossanak.

Logaritmikusan (10-es vagy R -alapú log) felvive az abszcisszára a vegyszerkoncentrációkat, az ordinátára pedig lineárisan a k törtszámmal kifejezett értékeit, gyakran nagyon zégzős vonalat kapnánk. Ezért úgy járunk el, hogy 3—3 egymásutáni vegyszerkoncentrációhoz tartozó k -értéket átlagolunk és a középértéket a közbülső vegyszerkoncentrációnál tüntetjük fel a grafikonban. Így végighaladunk az egész koncentrációsoron: mozgó-átlagolást végzünk. A kapott pontokat összekötve, sokkal simábban lefutó vonalat nyerünk. Az ennek és az 50%-os k -érték-vonalnak a metszéspontjához tartozó abszcissza adja — a logaritmusérték vissza-keresésével — a keresett közepes hatású dózist (m).

A grafikus eljárás helyett lehet tisztán számítási interpolálást is alkalmazni. Ekkor hármas mozgó átlagolás esetén Thompson (12) levezetése szerint a következő képletre van szükség:

$$\log m = L_a + \frac{d(K-1)}{2} + df,$$

ahol L_a az m kiszámításához figyelembevett koncentrációsor első dózisának (D_a) logaritmus, d a hígítási faktor (R) logaritmus, K az egyszerre átlagolt k -értékek száma, f pedig a következőképpen kiszámítható érték:

$$f = \frac{\frac{K}{2} \cdot k_0 - k_a - k_{a+1} \dots - k_{a+K-1}}{k_{a+K} - k_a}$$

ahol $k_a \dots k_{a+K}$ az egymásutáni koncentrációkhoz, k_0 pedig a vegyszermentes kontrollhoz tartozó sebességi állandó értékeket jelzi.

Ha K értéke 3, akkor

$$f = \frac{1,5 k_0 - k_a - k_{a+1} - k_{a+2}}{k_{a+3} - k_a}$$

és

$$\log m = \log D_a + \log R \left(1 + \frac{1,5 k_0 - k_a - k_{a+1} - k_{a+2}}{k_{a+3} - k_a} \right).$$

Mindez természetesen csak akkor érvényes, ha

$$0 \leq f \leq 1$$

amiről úgy győződhetünk meg, hogy előre kiszámítjuk a

$$k_a + k_{a+1} + k_{a+2} + k_{a+3} - 1,5 k_0$$

kifejezés értékét. Ha ez belesik a k_a és k_{a+3} értékek által jelzett közbe, akkor m -re helyes eredményt kapunk. Ha a k -értékeket k_0 törtrészeiben fejezzük ki, akkor $k_0 = 1$ lévén, a fenti kifejezések egyszerűsödnek.

Az m -érték szórását úgy állapítjuk meg, hogy a párhuzamosan elvégzett vizsgálat sorozatokból kapott log m -értékek átlagát és standard eltérését a szokásos módon kiszámítjuk.

A késlekedési fázis meghosszabbodásának mérése

A mikróbagátló behatás mehanizmusának teljesebb megvilágítását szolgálja az az eljárás, mellyel a közepes hatású dózison túl a szaporodás késlekedési szakaszának meghosszabbodását is mérjük. Ez rendszerint grafikusan történik. A szaporodási görbe exponenciális szakaszának vonalát visszafele meghosszabbítva, extrapolálással megállapítjuk azt az időtartamot, melynek egy meghatározott (aránylag kis) csíraszám (például $10^6/\text{ml}$) eléréséig el kellett telnie a fejlődés során. Ennek a határcsíraszámnak az értékét természetesen önkényesen lehet csak felvenni. Mírderegetre megválasztásánál figyelembe kell venni, hogy lehetőleg közel legyen a kezdő csíraszámhoz és a logaritmikus fázis kezdetéhez.

Penészeknél a lineáris szakasz visszafelé való meghosszabbításával egy meghatározott kis átmérőértékig (10 mm) extrapoláltunk.

A maximális csíraszám mérése

A gátló hatások az adott táplálóoldatban élő mikróbák maximális csíraszámát (G) is befolyásolhatják. A G meghatározása egyszerűen a kísérlet végén hosszabb idő alatt, a megállapodási szakaszban tapasztalható maximális extinkció értékének a kalibrációs adatok alapján csíraszámra való átszámításából áll. Ezeket az értékeket a koncentráció függvényében felrajzoltuk.

A módszer alkalmazása néhány vegyszer összehasonlító vizsgálatára

A mikróbagátló hatás mérését szolgáló módszer alkalmazásának megvilágítására néhány, *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus*-szal (Tokaj 22, Szőlészeti Kutató Intézet), *Torulopsis utilis* var. *maior*-ral (Thaysen et Morris), *Bacillus cereus*-szal és *Aspergillus foetidus*-szal (Szőlészeti Kutató Intézet) végzett kísérletet mutatunk be. Az alkalmazott gátló hatás vegyszeres eredetű volt. Kipróbálásra került a dehidroecetsav (DHE : Na sója alakjában adagolva, de — a *Bacillus* esetének kivételével — savban megadva), a benzoésav Na-sója ($BEN-Na$), a hangyasav Na-sója ($HAN-Na$), egy a brómcetsav észterének keverékét tartalmazó készítmény (PAN : »Pandurool A« dán konzerválószer-preparátum) és egy kvanterner ammóniumbázis, a cetilpiridiniumbromid (CPB).

*A szaporodási sebesség**Kísérletek Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus-szal*

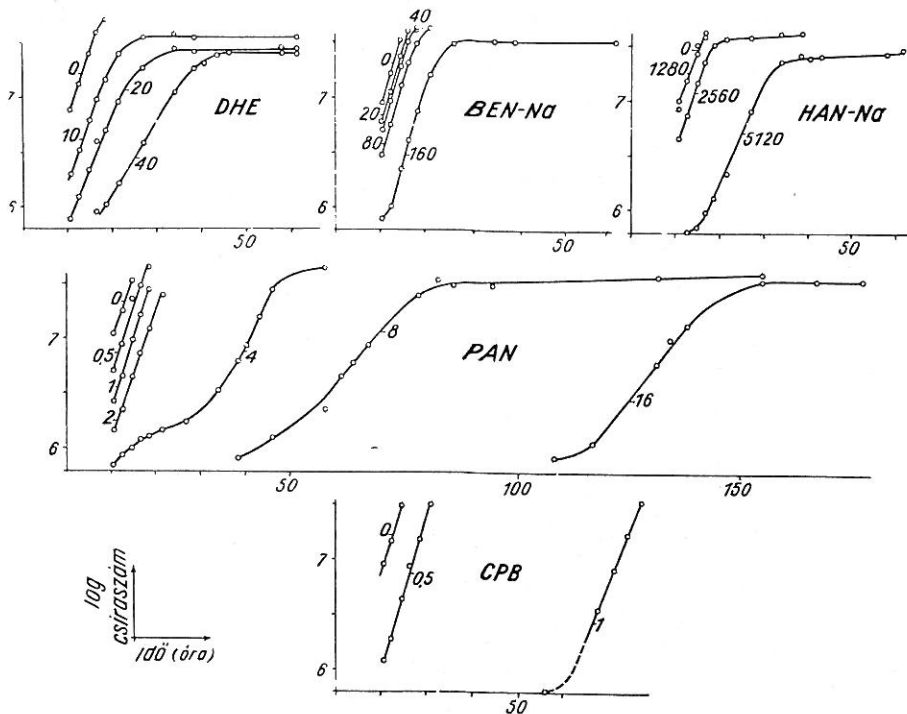
Az alap tápláló oldat 20 tf% (1 + 10) élesztőfőzethől, 0,5% peptonból (Witte), 1% kristálycukorból és 30 tf% McIlvaine-féle dinátriumfoszfát (0,2 m) + citromsav (0,1 m) pufferből és csapvízből állt. Tojásfehérjés derítés után a (2 atm. túlnyomásig melegítéssel) sterilizált oldat kristálytiszta volt, pH-ja 4,75.

Ennek az oldatnak 20 ml-es, 18 mm külső átmérőjű kémcsövekben levő próbáihoz változó mennyiségű tömény vegyszeroldatokat (deszt. vízben) adtunk úgy, hogy az egyes vegyületekből olyan hígítási sort kapjunk, melynek minden tagja az előző tagnál kétszer hígabb (illetőleg töményebb).

Az így nyert és a vegyszermentes ellenőrző oldatokat a 4 napos ágáros élesztőtenyészből készített szuszpenzió 0,05—0,05 ml-ével oltottuk be. A minták kezdő összes csíraszámuk ml-enként $1,8 \cdot 10^5$ volt. Vízhőmérsékletbe tettük a csöveket úgy, hogy azok hőmérséklete 31°C legyen. Időközönként sorra kivettük a mintákat és

alapos felrázás után a már hivatkozott módon (14) Pulfrich-féle fotométerben megmértük a fényelnyelésüket.

A tápláló oldat adatával kisebbített (korrigált) extinkcióadatokat a kalibrációs görbéből, illetőleg az ebből levezetett képlet segítségével csíraszámra számoltuk át. A csíraszámok logaritmusait az idő függvényében ábrázolva, megkaptuk a szaporodási görbéket (2. ábra). Ebből kiszámoltuk a generációs időt (T) illetőleg a szaporodási sebességi állandót (k), melyet azután mindig a kontrol k -értékének tört részeire számítottunk át (1. táblázat).



2. ábra

Sacch. cerevisiae var. *ellipsoideus* szaporodási görbéi néhány vegyszer jelenlétében. — A görbék melletti számok a vegyszerkoncentrációt jelzik (mg/l)

A közepes hatású dózis (m) kiszámítására nézve számpéldaként álljon itt a Pandurol esete. Először megállapítjuk, mely k -értékeket kell alapul vennünk az értékelésnél. Mint láttuk, itt a feltétel az, hogy f ne legyen sem negatív, sem $+1$ -nél nagyobb szám. Ez a feltétel akkor teljesül ($K = 3$ esetén), ha a

$$k_a + k_{a+1} + k_{a+2} + k_{a+3} - 1,5$$

kifejezés értéke belesik a k_a és k_{a+3} által határolt közbe.

Ha kísérletképpen k_a -t 0,95-nek vesszük, akkor

$$k_a + k_{a+1} + k_{a+2} + k_{a+3} - 1,5 = 0,95 + 0,72 + 0,40 + 0,42 - 1,5 = 0,99,$$

tehát nem esik bele a 0,95 ($= k_a$) és a 0,42 ($= k_{a+3}$) által határolt közbe.

Ha k_a -t 0,72-nek vesszük, akkor

$$k_a + k_{a+1} + k_{a+2} + k_{a+3} - 1,5 = 0,72 + 0,40 + 0,42 + 0 - 1,5 = 0,04$$

ami belesik a 0,72 és 0 által határolt közbe. Vagyis az utóbbi esetben k_a -t jól választottuk meg.

Így elkezdhethetjük a számítást: $\log m = \log 4 + \log 2 \left(1 + \frac{1,5 - 0,72 - 0,40 - 0,42}{0 - 0,72} \right) = 0,931727$
 ahonnan $m = 8,5$ mg/l

1. táblázat

Néhány vegyszer hatása a *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* szaporodási sebességére

(1) A vegyszer		(4)	(5)
(2) jelzése	(3) koncentrációja (mg/l)	k (relatív érték)	m (mg/l)
DHE	0	1,00	35
	10	0,91	
	20	0,80	
	40	0,54	
	80	0	
	160	0	
	320	0	
	640	0	
BEN-Na	0	1,00	240*
	20	1,00	
	40	1,00	
	80	1,00	
	160	1,06	
	320	0	
	640	0	
	1280	0	
HAN-Na	0	1,00	> 5120
	80	1,00	
	160	1,00	
	320	1,00	
	640	1,00	
	1280	1,00	
	2560	1,09	
	5120	0,89	
PAN	0	1,00	8,5
	0,5	1,05	
	1	1,05	
	2	0,95	
	4	0,72	
	8	0,40	
	16	0,42	
	32	0	
CPB	0	1,00	1,2
	0,5	1,00	
	1	0,78	
	2	0	
	4	0	
	8	0	
	16	0	
	32	0	

* A 160 és 320 mg/l közti koncentrációsávban finomabban gradált kísérletsorozat tudná itt az m helyesebb értékét megadni (6).

A többi vegyszernél a kiszámítás ugyanígy történt. A hangyasavnál az alkalmazott legnagyobb koncentráció sem tudta 0,89 alá leszorítani a k értékét, ezért ez a sorozat kiértékelhetetlen.

Az m grafikus megállapítása során úgy járunk el, hogy 3–3 egymásután következő k -érték átlagát vesszük és ezt a középsőnek megfelelő vegyszerkoncentrációnál felrajzoljuk (a koncentrációkat logaritmikusan vittük fel az abszcisszára).

Így az előbbi példában (a Pandurolnál) a mozgó átlagokat a. 2. táblázat tünteti fel (2. táblázat; 3. ábra).

2. táblázat

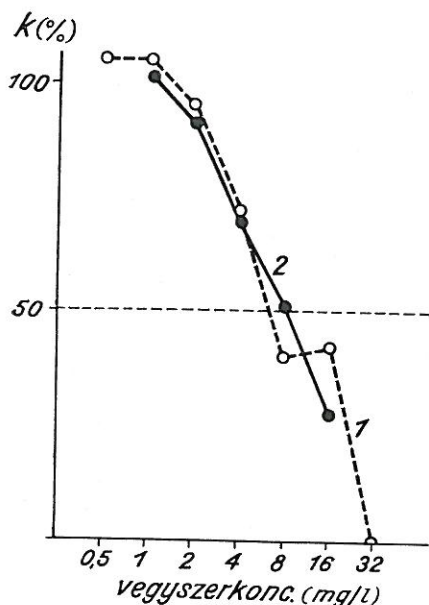
A közepes hatású dózis megállapítása mozgó átlagolással

(1) Koncentráció (mg/l)	k	
	relatív érték (2)	mozgó átlag (3)
0	1,00	
0,5	1,05	
1	1,05	1,010
2	0,95	0,907
4	0,72	0,690
8	0,40	0,513
16	0,42	0,273
32	0	

Látható, hogy a grafikus interpolálásból is körülbelül ugyanaz az érték (8,5 mg/l) jön ki m -re, de itt a grafikus szerkesztés nehézségei, pontatlansága miatt az eredmény pontossága is korlátozottabb.

Kísérletek *Torulopsis utilis* var. *maior*-ral

Ugyanezen vegyszereket egy torulára is kipróbáltuk. A kísérleti elrendezés, tápoldat, vegyszerkoncentrációk stb. az előbbiekkal azonosak voltak azzal az eltéréssel, hogy itt beoltásra a *Torulopsis utilis* var. *maior*t (Thaysen et Morris) használtuk. 5 napos ágártenyészetéből sterilvizet szuszpenziót készítettünk, melynek 0,05–0,05 ml-ével oltottuk be a kémcsövekben levő tápláló oldatokat, úgy, hogy ezekben $3,3 \cdot 10^5$ volt a kezdő csíraszám ml-enként. — A kísérlet eredményeit a 3. táblázat mutatja.



3. ábra.

A közepes hatású dózis megállapítása mozgó átlagokból grafikus interpolálással. — 1: kísérleti adatok; 2: mozgó átlagok.

gúljon fel (a dehidroecetsavnál itt

A beoltást a jelzett baktérium 1 napos folyadéktenyészetével (csak vegetatív sejtek) végeztük úgy, hogy 0,04—0,04 ml-t vive a kémcsövekbe, a beoltott tápláló oldatokban a kezdő csíraszám ml-enként $5,4 \cdot 10^5$ legyen. Az inkubálás 31°C -on történt.

Az oldatok zavarosodását a már ismertetett módon mérve, a szaporodási sebességi állandót és a közepes hatású dózist kiszámítottuk. Az eredményeket a 4. táblázat szemlélteti.

A 4. táblázatból látható, hogy a Pandurol-adagolás túl nagy koncentrációval kezdődött ($k = 0,39$) és így az m nem számítható ki. Ugyanez vonatkozik a cetilpiridiniumbromidra is.

Kísérletek *Bacillus cereus*-szal

A már említett vegyszereket egy zöldborsóról izolált *Bacillus cereus* törzssel szemben is megvizsgáltuk gátló hatásra nézve. Itt természetesen más tápláló közegre volt szükség, miután 4,7 körüli pH-n a baktériumok többnyire nem fejlődnek.

A tápláló oldat 40 tf% (1 + 9) zöldborsó kivonatot, 0,5% peptont és 0,2% kristálycukrot tartalmazott 7,0 pH-s m/15 foszfátpufferben. A kivonatot 1 súlyrész zöldborsó örlemény és 9 súlyrész 7,0 pH-s foszfátpuffer keverésével és centrifugálásával állítottuk elő. A (tojással) derített tápláló oldatot 10 ml-es adagokra bontva, 18 mm külső átmérőjű kémcsövekben 2 atm. túlnyomásig melegítve sterilizáltuk. pH-ja 7,00 volt.

A vegyszereket — a Pandurol és a cetilpiridiniumbromid kivételével — szilárd alakban adtuk a tápláló oldatokhoz, hogy a nagy vegyszeradagok oldatban való hozzáadásával a tenyésztő oldat ne hí- a szilárd Na-sót adagoltuk: DHE-Na).

Kísérletek *Aspergillus foetidus*-szal

Tanulmány tárgyává tettünk ezekután egy penésztörzset is. A tápláló közeg itt szilárd volt. 20 tf% (1 + 10) élesztőfőzetet, 0,5% peptont, 1% kristálycukrot és 30 tf% foszfátcitrát (McIlvaine)-puffert tartalmazó csapvizet oldatban 5% ágárt oldottunk fel. Adagolás után gőzöléssel sterilizáltuk. pH-ja 4,25 volt.

A vegyszereket felhasználás előtt tömény oldatban petricsészébe vittük majd forró, olvadt tápláló közeggel leöntöttük és egyenletesen elkevertük. A megszilárdult lemezek közepére egy-egy kis kacsnyi, 2 hetes *Aspergillus foetidus* tenyészetből származó konidium-szuszpenziót vittünk, majd 31°C -os termosztátban inkubálva, időközönként mértük a telepátmérőket (4. ábra).

A szaporodás egyenes szakaszában kiszámítva az óránkénti növekedést mm-ben (k), megkaptuk a közepes hatású dózist is. — Az adatokat az 5. táblázat szemlélteti.

3. táblázat

Néhány vegyszer hatása a *Torulopsis utilis* var. maior szaporodási sebességére

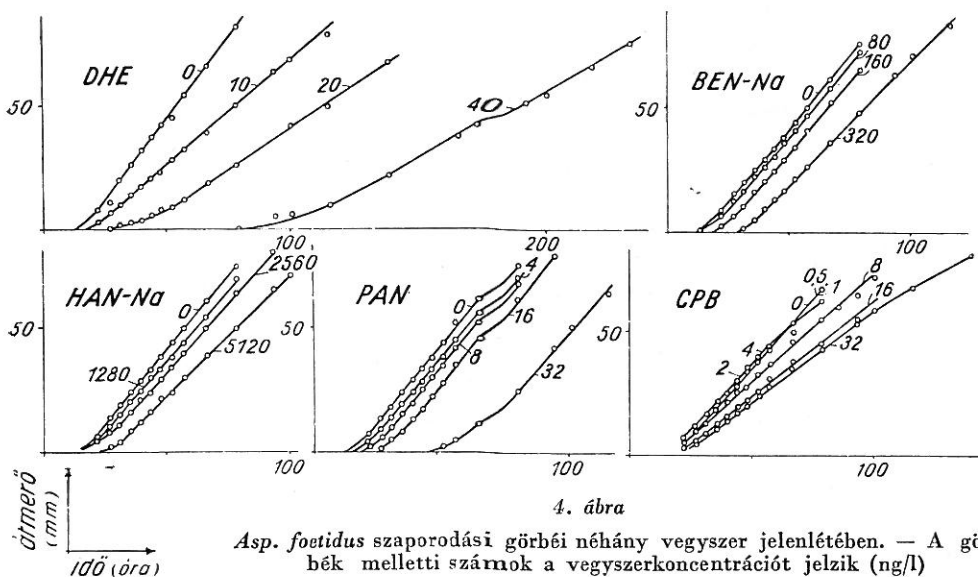
(1) A vegyszer		(4)	(5)
(2) jelzése	(3) koncentrációja (mg/l)	k (relatív érték)	m (mg/l)
DHE	0	1,00	30
	10	0,735	
	20	0,865	
	40	0,32	
	80	0	
	160	0	
	320	0	
	640	0	
BEN-Na	0	1,00	160
	20	1,00	
	40	1,00	
	80	0,785	
	160	0,685	
	320	0,05	
	640	0	
	1280	0	
HAN-Na	0	1,00	3000
	80	1,00	
	160	1,00	
	320	1,00	
	640	1,165	
	1280	0,965	
	2560	0,74	
	5120	0,02	
PAN	0	1,00	3,9
	0,5	1,14	
	1	1,22	
	2	0,665	
	4	0,45	
	8	0,35	
	16	0,18	
	32	0	
CPB	0	1,00	2,0
	0,5	0,91	
	1	0,67	
	2	0,50	
	4	0,31	
	8	0,295	
	16	0,345	
	32	0,085	

4. táblázat

Néhány vegyszer hatása a *Bacillus cereus* szaporodási sebességére

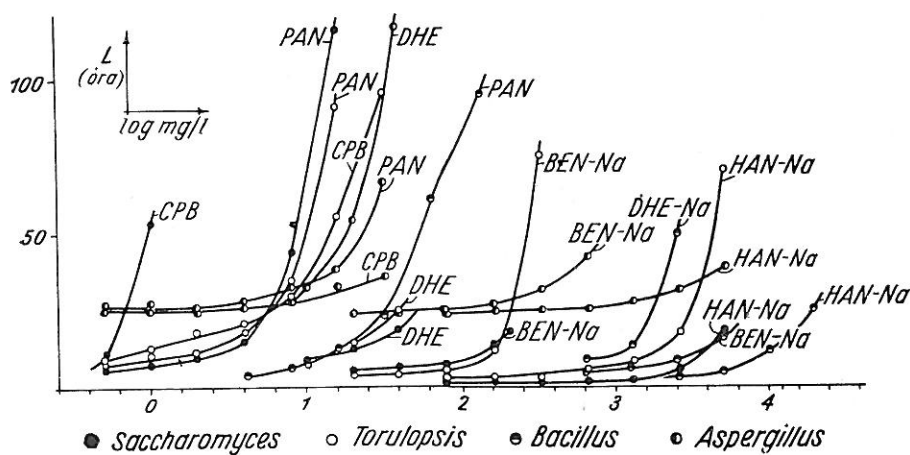
(1) A vegyszer		(4)	(5)
(2) jelzése	(3) koncentrációja (mg/l)	k (relatív érték)	m (mg/l)
DHE-Na	0	1,00	1400
	625	0,88	
	1250	0,50	
	2500	0,27	
	5000	0	
	10000	0	
	20000	0	
	40000	0	
BEN-Na	0	1,00	3300
	625	1,00	
	1250	0,69	
	2500	0,64	
	5000	0,45	
	10000	0	
	20000	0	
	40000	0	
HAN-Na	0	1,00	1700
	625	0,50	
	1250	0,50	
	2500	0,53	
	5000	0,43	
	10000	0,34	
	20000	0,21	
	40000	0	
PAN	0	1,00	<4
	4	0,39	
	8	0,33	
	16	0,42	
	32	0,27	
	64	0,08	
	128	0,05	
	256	0	
CPB	0	1,00	<4
	4	0,06	
	8	0	
	16	0	
	32	0	
	64	0	
	128	0	
	256	0	

Látható, hogy hangyasavas Na-ra, Pandurolra és cetilpiridiniumbromidra nézve az alkalmazott legnagyobb koncentrációk is túl kicsinyek voltak ahhoz, hogy 50% körüli bénítást lehessen elérni velük.



A késlekedési szakasz

Az előbb felsorolt kísérletekből mindig megállapítottuk a késlekedési fázis tartamát is. Az L értékét, elhatározásunk szerint, az az órákban kifejezett idő adta meg, mely eltelt, amíg a kezdő csíraszám a *Saccharomyces*-nél és a *Torulopsis*-nél 10^6 /ml-re, a *Bacillus*-nál 10^7 /ml-re emelkedett, az *Aspergillus* esetén pedig, amíg az átmérő 10 mm-re növekedett. A grafikus extrapolálással kapott L -értékeket a különböző vegyszereknél és mikrobáknál az 5. ábra mutatja be.



5. táblázat

Néhány vegyszer hatása az *Aspergillus foetidus* szaporodási sebességére

(1) A vegyszer		k		(6) m (mg/l)
(2) jelzése	(3) koncentrációja (mg/l)	(4) mm óra	(5) relatív érték	
DHE	0	1,30	1,00	22
	10	0,84	0,65	
	20	0,65	0,50	
	40	0,575	0,44	
	80	0	0	
	160	0	0	
	320	0	0	
	640	0	0	
BEN-Na	0	1,18	1,00	400
	20	1,18	1,00	
	40	1,18	1,00	
	80	1,18	1,00	
	160	1,18	1,00	
	320	1,13	0,96	
	640	1,00	0,85	
	1280	0	0	
HAN-Na	0	1,19	1,00	≥ 5120
	80	1,19	1,00	
	160	1,19	1,00	
	320	1,19	1,00	
	640	1,19	1,00	
	1280	1,11	0,93	
	2560	1,14	0,96	
	5120	0,97	0,815	
PAN	0	1,19	1,00	≥ 32
	0,5	1,19	1,00	
	1	1,19	1,00	
	2	1,19	1,00	
	4	1,19	1,00	
	8	1,19	1,00	
	16	1,26	1,06	
	32	1,14	0,96	
CPB	0	1,12	1,00	> 32
	0,5	1,12	1,00	
	1	1,12	1,00	
	2	1,09	0,915	
	4	1,09	0,915	
	8	0,89	0,75	
	16	0,775	0,65	
	32	0,74	0,625	

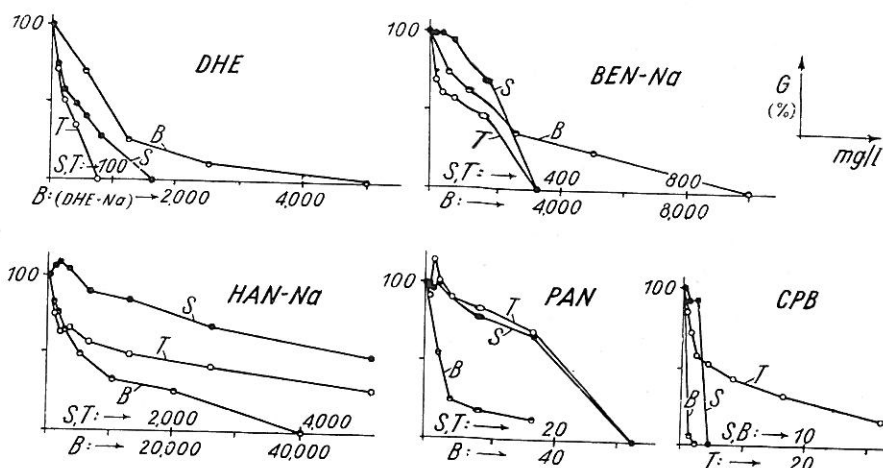
A maximális csíraszám

Az egyes mintákban a kísérlet végéig (180—260 óra) elért maximális csíraszámot (= összes szaporulatot = G) a már említett módon az ismertetett kísérleteknél (az aszpergilluszos kísérlet kivételével) meghatározva az eredményeket vegyszerek szerint csoportosítva, a 6. ábrában vázolt képet kaptuk.

Az eredmények értékelése

A szaporodási sebességi állandó és az összes szaporulat összefüggése

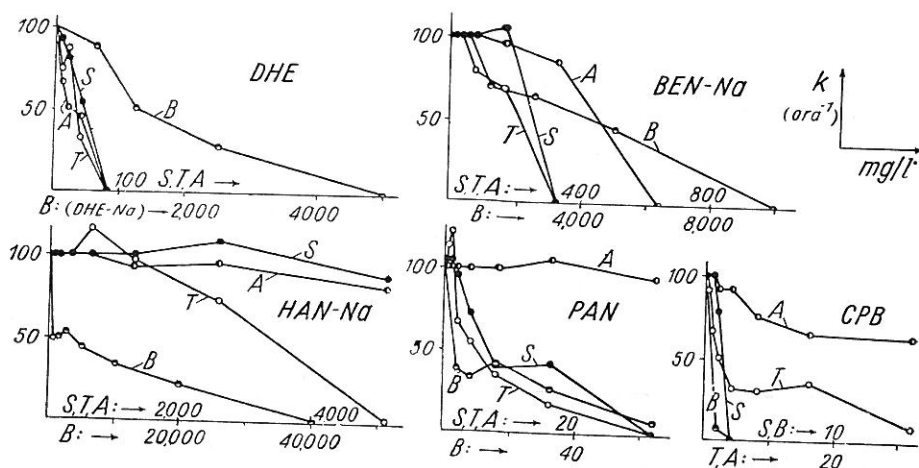
A szaporodási sebességi állandóval a 6. és a 7. ábra szerint a maximális csíraszám általában párhuzamosan változott.



6. ábra

Vegyszerek hatása néhány mikroorganizmus maximális csíraszámára. — S: *Saccharomyces*, T: *Torulopsis*, B: *Bacillus*

Feltűnő kivételt csak a Pandurol esetében találunk a *Saccharomyces*-nél és a *Torula*-nál, ahol a G a vegyszerkoncentráció növelésére lassabban reagált, mint a k , továbbá a hangyasavas nátriumnál, ahol a k csökkent vontatottabban, mint a G



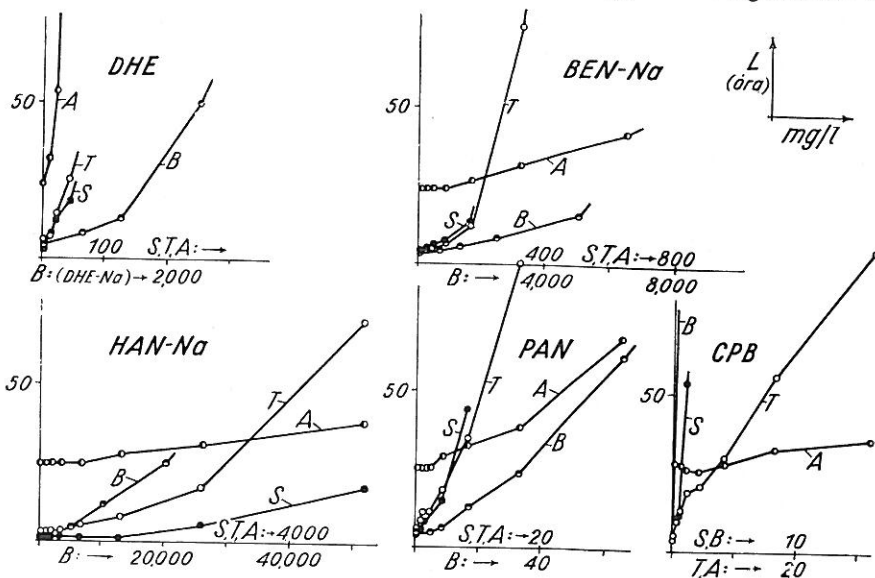
7. ábra

Vegyszerek hatása néhány mikroorganizmus szaporodási sebességére. — S: *Saccharomyces*, T: *Torulopsis*, B: *Bacillus*, A: *Aspergillus*

A szaporodási sebességi állandó és a késlekedési fázis időtartamának összefüggése

Ami a késlekedési fázis és a szaporodási sebesség viszonyát illeti, itt már közelítőleg sem mondható el, hogy a párhuzam megvolna. Már maguknak a szaporodási görbe-sorozatoknak az alakjából is jól látható, hogy vannak vegyszerek, melyek a k -ra gyakorlatilag semmi befolyást nem gyakorolnak, ugyanakkor, amikor a késlekedési szakaszt erősen megnyújtják. Más esetben a fordítottja tapasztalható. Világosan megfigyelhető ez, ha a 7. ábrát a 8. ábrával vetjük egybe.

A dehidroecetsavnál például eléggé együttjár a késlekedési fázis meghosszabbodása és a szaporodási sebesség csökkenése mind a négy mikroorganizmus esetén.



8. ábra

Vegyszerek hatása néhány mikroorganizmus szaporodásának késlekedési szakaszára, — S: *Saccharomyces*, T: *Torulopsis*, B: *Bacillus*, A: *Aspergillus*

A Pandurol azonban láthatólag alig hat az *Asp. foetidus* szaporodási sebességére, annál erősebben a késlekedési fázisára. A cetilpiridiniumbromid ellenkezőleg az *Asp. foetidus* késlekedési szakaszát hagyja változatlanul, csak a szaporodási sebességre hat (l. a 4. ábra megfelelő görbéit!).

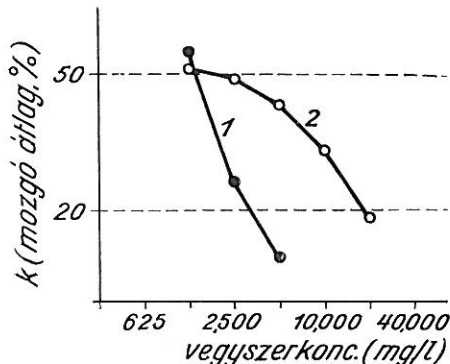
Miután az L -értékek nagyobbodása legtöbbször nem jelenti a szaporodás megszűntét, hanem csak kitolódását, praktikus szempontból a késlekedési szakasz adatai általában kevesebbet mondanak, mint a szaporodási sebességi állandók. Míndenestire a csak az L -re ható vegyszerek is értékesek lehetnek gyakorlatilag, abban a koncentrációban, melyről a késlekedési szakasz oly mérvű meghosszabbodást mutat, hogy közben az inokulum sejtjei elpusztulnak.

A szaporodási sebességre gyakorolt hatás közelebbi jellemzése

A vegyszerek gátló hatásának összehasonlító jellemzésére az eddigiek alapján a közepes hatású dózis (m) megadása elég jól használhatónak látszik. Kétségtelen azonban a fentiekből folyóan, hogy például a késlekedési szakasz ismerete nélkül nem teljes a kép a vegyszer hatásának természetéről. Sőt az m -érték önmagában még a szaporodási sebességre gyakorolt gátló hatást nem definiálja mindig egyér-

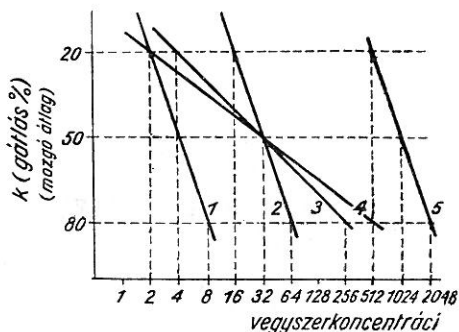
telműen. A mozgó átlagos k — log vegyszerkoncentráció-görbék hajlásszöge ugyanis gyakran különböző és így előfordulhat, hogy két vagy több vegyszernek ugyanaz a közepes hatású koncentrációja, mégis egészen más vegyszertöménységek csökkentik a szaporodási sebességet például 80%-osan (9. ábra).

Igy a *Bacillus*-nál látható, hogy 50%-os szaporodási sebesség csökkenést dehidroecetsavas nátriumból 1400, nátriumformiátból pedig 1700 mg/l idézett elő, tehát elég közeli m -értékekről van szó. A 80%-os gátláshoz szükséges koncentrációk azonban már egészen másként alakulnak: dehidroecetsavas Na-ból 3 200, hangyasavas Na-ból pedig 18 000 mg/l kell, tehát ezen a gátlási síkon vizsgálva, a hangyasav közel hatszor gyengébb, mint a dehidroecetsav.



9. ábra

A hangyasav és a dehidroecetsav különböző hatása *Bacillus cereus* szaporodási sebességére — 1: dehidroecetsavas nátrium, 2: hangyasavas nátrium



10. ábra

Különböző dózis-hatás-görbék

Célszerűnek találnánk ezért a vegyszerek jellemzése szempontjából az m mellett a mozgó átlagos k — log koncentráció-görbe hajlásszögének, vagy, ami egyre megy, például a 20 és a 80%-os gátlást okozó vegyszerkoncentrációknak a megadását is. Ez áttekinthetőség céljából esetleg olyanformán is történhetne, hogy az m mellé feltüntetnénk a 20 és 80%-os gátláshoz tartozó dózisok (D_{20} és D_{80}) által határolt koncentráció-sáv nagyságát, esetleg az m értékének százalékában kifejezve:

$$100 \cdot \frac{D_{80} - D_{20}}{m}$$

Ha például $m = 1024$, $D_{80} = 2048$, D_{20} pedig $= 512$, akkor a vegyszer hatását a mikroorganizmus szaporodási sebességi állandójára a következőképpen lehetne jellemezni: $m = 1024$ (150%).

$$\frac{100 (D_{80} - D_{20})}{m} \quad \text{értéke ugyanis:} \quad 100 \cdot \frac{1536}{1024} = 150$$

Gyakorlatilag az olyan vegyszer ér többet, melynek m -értéke és $\frac{100 (D_{80} - D_{20})}{m}$ értéke kisebb. A 10. ábrában például az 1., 2. és 5. görbének megfelelő vegyszerek közül, melyek $\left(\frac{100 (D_{80} - D_{20})}{m} \right)$ -értéke egyformán 150, kétségtelenül az 1. a legjobb

$m = 4$ miatt. A 2., 3., és 4. vegyszerek közül a 2.-nél ez az érték 150, a 3.-nál 788, a 4.-nél 1593 és így — bár m egyformán 32, — a 2. sokkal hatékonyabb, mint a másik kettő.

Hasonlóképpen meg lehetne adni a mozgóátlagos $k - \log D$ -görbe hajlásszögét a D_{80} és az m hányadosával is:

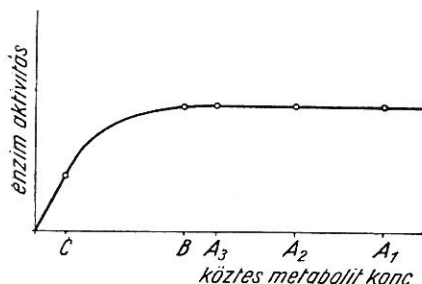
$$Q = \frac{D_{80}}{m}.$$

Az előbbi példában, ahol $m = 1024$, $D_{80} = 2048$, $Q = 2$.

A szaporodási sebességi állandó és a gátló hatás mechanizmusa

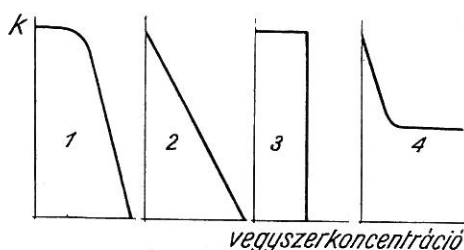
A vegyszerkoncentrációnak és a szaporodási sebességi állandónak az összefüggése az egyes vegyszerek különböző mikroorganizmusokra gyakorolt hatásának természetéről további támpontokat is nyújthat.

Hinshelwood (4) elgondolása szerint sok esetben a gátló anyag olymódon hat, hogy megakadályozza a sejtet valamely életfontosságú közbülső anyagcseretermék szükséges mértékben



11. ábra

A köztes metabolit-koncentráció csökkentésének hatása az enzimaktivitásra [Hinshelwood (4) szerint]



12. ábra

Különböző típusú vegyszerhatások mikroorganizmusok szaporodási sebességére [Hinshelwood (4) szerint]

való létrehozatalában. Az ezt a közbülső metabolitot mint szubsztrátot felhasználó enzimrendszer működése és így az egész sejt működése, szaporodása is csökken, lassul. A köztes metabolit koncentrációjától az enzim aktivitása (és ezen keresztül a mikróba szaporodási sebessége) a 11. ábrában látható módon függ.

Rendes körülmények között a sejtben a köztes metabolit töménysége A_1 , A_2 , A_3 körüli értékű. A vegyszer azonban ennek csökkentésére képes. Csak ha a B érték alá megy le a metabolit-koncentráció, kezd az enzimrendszer aktivitása csökkenni. Tehát csak egy bizonyos vegyszerkoncentráció felett jelentkezik gátló hatás, de ettől kezdve aztán B és C között már hirtelen erősödik. A vegyszertöménység és a gátlás közötti összefüggés ezért a 12. ábra 1. görbájében jelzett módon alakul.

Ugyanez az eredmény jöhet létre akkor is, ha a köztes metabolitnak nem a termelődését, hanem az enzim felületére való adszorbeálódását gátolja a vegyszer például azáltal, hogy maga is adszorbeálódik — a metabolithoz való szerkezeti hasonlósága révén — az enzimen és így úgynevezett »versengő gátlás« formájában akadályozza az életfontosságú metabolit enzim általi felhasználását.

Több esetben ilyen »küszöbérték« nem tapasztalható. Ekkor a 12. ábra a 2. görbéjével illusztrált helyzet áll elő. Itt a szaporodási sebesség a vegyszerkoncentrációval fordítottan (lineárisan) arányos.

Egy harmadik lehetőség az, hogy a vegyszer tisztán a késlekedési szakaszt nyújtja meg. Ilyenkor, ha az L -nek ez a megnyúlása olyan nagymértékű, hogy közben a sejtek elpusztulnak, akkor a vegyszerkoncentráció növelése során a k egy darabig megőrzi eredeti értékét, majd egy

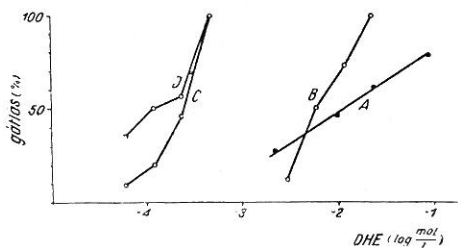
bizonyos vegyszertöménységen túl a szaporodás (a sejtek elpusztulása miatt) hirtelen teljesen megszűnik (12. ábra, 3. görbe).

Előfordul az is, hogy növekedő vegyszerkoncentrációnál a k -értéke eleinte csökken, aztán gyakorlatilag nem változik, még igen nagy dózisok hatására sem (12. ábra, 4. görbe). Ilyenkor vagy arról van szó, hogy a vegyszer molekulája — nagysága miatt — már nem tud adszorbeálódni az enzimfelületen akkor, amikor a kisebb molekulájú metabolit még talál el nem foglalt adszorpció helyet; vagy pedig az a magyarázat, hogy két alternatív szaporodási mechanizmus létezik, melyek közül az egyik érzékenyebb a vegyszerre, mint a másik.

Ezeknek a szempontoknak a figyelembevételével a szaporodási sebesség és a vegyszerkoncentráció összefüggése értékes bepillantást enged a vegyszerhatás tényleges történéseibe.

Az általunk vizsgált vegyszerek ebből a szempontból is több típusba tartoznak. Így például a dehidroecetsav a *Saccharomyces*-re, *Torulopsis*-ra, *Aspergillus*-ra látszólag küszöbérték nélkül hat (12. ábra, 2. görbe). Valószínűleg ez a helyzet a *Bacillus*-ra gyakorolt hatás esetén is.

A hangyasavnak és a Pandurolnak a *Bacillus*-ra, a cetilpiridiniumbromidnak a *Torulopsis*-ra és a *Bacillus*-ra kifejtett hatása hasonló típusúnak látszik.



13. ábra

A dehidroecetsav gátló hatása borostyánkősav-dehidrogenázra és néhány mikroorganizmusra

A benzoésavas nátrium hatása a 12. ábra 1. görbájének megfelelő meharizmusra (s így versengő gátlásra) vall. Ugyanez mutatkozik a hangyasavas nátriumnál *Saccharomyces*, *Torulopsis*, és *Aspergillus* esetén, a Pandurolnál *Aspergillus*, a cetilpiridiniumbromidnál *Torulopsis* és *Aspergillus* esetén, bár az utolsó három vegyszer próbái során ezek nem kerültek alkalmazásra kellő töménységben ahhoz, hogy egyes mikrobáknál nagyobb gátló hatás jelentkezzen.

Itt természetesen sok függ attól, milyen finom fokozatokban növeljük a vegyszerkoncentrációt. Ha ez eleinte túl nagy, nem tudhatjuk, kisebb töménységnél nem jelentkezik-e küszöbérték. A fenti példákra levont következtetések további, finomabban gradált kísérletek megerősítő eredményéig ezért még nem tekinthetők véglegeseknek.

Érdekes, hogy a Pandurol a *Saccharomyces*-re és a *Torulopsis*-ra kisebb koncentrációban némi stimuláló hatást gyakorol, ami után hirtelen erős gátlás következik.

Itt még egy kísérletünket említjük meg a hatásmechanizmus tisztázására.

Seevers és munkatársainak (11) vizsgálataiból ismeretes, hogy a dehidroecetsav az állatszövetek sokféle megvizsgált enzimrendszere körül csak a borostyánkősavdehidrogenázra hat komolyabban. 7,4 pH-s 0,1 M foszfátpufferben mérve a borostyánkősavoxidáz-rendszer O_2 -fogyasztását különböző dehidroecetsav-koncentrációknál, a 13. ábrában látható gátlási görbét (A) kapták. Emellett kimutatták, hogy a citokró-m-citokró-moxidáz részre a vegyszer nincs hatással.

Ha feltételezzük, hogy a mikroorganizmusok szaporodásának gátlása is a borostyánkősavdehidrogenáz bérítésével magyarázható, akkor a mikróbagátlás vonalának az előbbivel körülbelül párhuzamosan kell haladnia. Amint a 13. ábrából látható, a *Bacillus* gátlási vonala (B) nem fut párhuzamosan a borostyánkősavdehidrogenázéval, bár mindenestre azonos koncentrációsávban mozog. Ez sem mondható el azonban a *Saccharomyces*-ről (C) és az *Aspergillus*-ról (D), melyeket már lényegesen (pl. 100-szor) kisebb dehidroecetsavkoncentrációk is gátlóknak. Ez

arra vall, hogy a gátlási mechanizmus — legalábbis a *Saccharomyces* és az *Aspergillus* esetén — nem érinti a borostyánkősavdehidrogenáz működését. Kétségtelen viszont, hogy az utóbbi két mikróbánál a pH-viszonyok egészen mások voltak (4,75 illetőleg 4,25), mint az enzim vizsgálatakor (7,4). A *Bacillus* esetén, 7 pH-s tápoldatban az eredmények közelebb estek. Lehetséges tehát, hogy a baktériumok gátlása azok borostyánkősavdehidrogenázának bérítésén is alapszik. A többi mikroorganizmusra vonatkozólag tisztább képet csak akkor kaphatnánk, ha az említett enzimnek kisebb pH-kon való gátlási adatait ismernénk.

A vizsgált vegyszerek értékelése

A mikróbagátlási adatokat vegyszerek és mikroorganizmusok szerint összefoglalva, figyelembe kell venni azt a tényt, hogy a gyenge sav természetű gátlóanyagok hatása rendszerint a nemdisszociálódó savmolekulához van kötve [Rahn és Conn (8), Vas és Ingram (15), Schelhorn (9)]. Miután pedig különböző pH-kon a nemdisszociált rész százalékos aránya erősen különbözhet, összehasonlításoknál mindig figyelembe kell venni ezt a tényt is és a ténylegesen ható részre átszámítani a koncentrációadatokat. Így az úgynevezett »abszolút hatékonyság«-ot [Schelhorn (10)] kapjuk meg. Ebből — a mindenkori pH és a vegyszer disszociációs állandójának ismeretében — az adott esetben jelentkező tényleges vegyszerszükségletet ki lehet számítani.

A 6. táblázat tartalmazza az eddig nyert közepes hatású dózis értékeket és »teljes« gátlási adatokat összes savra és nemdisszociált savra átszámítva.

6. táblázat

Vegyszerek közepes hatású dózis-értékei és »teljes« gátlási adatai néhány mikroorganizmus esetén

(1) Mikroorganizmus	(2) Kezdő csíra- szám (sejt/ml)	pH	(3) Vegyszerszükséglet (mg/l)									
			(4) gyenge savnál savra átszámítva					(5) nemdisszociált vegyületre átszámítva				
			DHE	BFN	HAN	PAN	CPB	DHE	BEN	HAN	PAN	CPB
<i>Bacillus cereus</i>	$5,4 \cdot 10^5$	7,00	1100 4000	2800 8500	1100 27000	<4 256	<4 8	21 75	4 13	0,6 15	<4 256	<4 8
<i>Sacch. cerevisiae</i>	$1,8 \cdot 10^5$	4,75	35 80	200 270	≥ 3460 ≥ 3460	8,5 32	1,2 2	27 62	42 57	≥ 320 ≥ 320	8,5 32	1,2 2
<i>Torul. utilis</i>	$3,3 \cdot 10^5$	4,75	30 80	140 540	2000 >3460	3,9 32	2 >32	23 62	30 114	180 >320	3,9 32	2 >32
<i>Asp. foetidus</i>		4,25	22 80	340 1100	≥ 3460 ≥ 3460	≥ 32 ≥ 32	>32 ≥ 32	20 73	160 500	≥ 830 ≥ 830	≥ 32 ≥ 32	>32 ≥ 32

Döltészedésű számok : 50%-os szaporodási sebesség-gátlás. Álló számok : »teljes« gátlás

A 6. táblázat adatai elsősorban a gátló hatás értékelési metodikájának bemutatására szolgálnak. További sorozatvizsgálatok és ezek statisztikai elemzése fogja az egyes vegyszerek értékének végleges sorrendjét megadni.

A felsorolt kísérletekben a gátló hatás vizsgálatáról volt szó. Természetesen ugyanezen szempontok szerint lehet a szaporodást elősegítő behatásokat is tanulmányozni. A meghatározott mérvű stimulálást felmutató koncentrációk kiszámí-

tása a fentiek szerint végrehajtható. A mozgóátlagos dózis — hatás-görbe hajlászöge itt is hasznos támpontot ad a vegyszerek értékeléséhez.

Befejezésül köszönetünket fejezzük ki Nyerges Pálnénak (Szőlészeti Kutató Intézet) a vizsgálatokban felhasznált szaharomicesz- és aszpergillusz-törzs átengedéséért.

Összefoglalás

A mikroorganizmusok növekedését elősegítő vagy gátló behatások kvalitatív és kvantitatív megismerésére jól felhasználhatók a sejt szaporodás-kinetikai mérések. A néhány vegyszer különböző koncentrációja jelenlétében baktériumokkal, élesztőkkel és penészekkel felvett szaporodási görbék elemzése, a késlekedési fázis, az exponenciális szaporodási sebességi állandó és az összes szaporulat kvantitatív értékelése módot ad az egyes vegyszerek hatékonyságának mennyiségi összehasonlítására és egyben bepillantást nyújt a vegyszer hatásmechanizmusába.

A kísérletek során új eljárást dolgoztunk ki a közepes hatású dózis megállapítására és a szaporodási sebességre gyakorolt hatás közelebbi, számszerű jellemzésére.

Érkezett: 1954. március 15.

Irodalom

1. Barbour, R. G. H. & Vincent, J. M.: J. Gen. Microbiol., **4**, 110. 1950
2. Cavill, G. W. K., Phillips, J. N. & Vincent, J. M.: J. Soc. Chem. Ind., **68**, 12. 1949.
3. Cavill, G. W. K. & Vincent, J. M.: J. Soc. Chem. Ind., **68**, 189. 1949
4. Hinshelwood, C. N.: The Chemical Kinetics of the Bacterial Cell, Clarendon Press, Oxford, 1946.
5. Monod, J.: Recherches sur la croissance des cultures bactériennes, Hermann, Paris, 1942.
6. Murrell, W. G. & Vincent, J. M.: J. Soc. Chem. Ind., **69**, 109. 1950.
7. Osgood, E. E. & Gamble, B.: J. Lab. & Clin. Med., **32**, 444. 1947.
8. Rahn, O. & Conn, J. E.: Ind. Eng. Chem., **36**, 185. 1944.
9. Schelhorn, M. von: Z. Lebensm.-Unters. u. Forsch., **92**, 256. 1951.
10. Schelhorn, M. von: Food Technol., **7**, 97. 1953.
11. Seevers, M. H., Shidemann, F. E., Woods, L. A., Weeks, J. R. & Kruse, W. T.: J. Pharm. & Expl. Therap., **99**, 69. 1950.
12. Thompson, W. R.: Bact. Revs., **11**, 115. 1947.
13. Tomkins, R. G.: Transactions Brit. Mycol. Soc., **17**, 150. 1932.
14. Vas, K.: Agrokémia és Talajtan, **3**, 131. 1954.
15. Vas, K. & Ingram, M.: Food Manufact., **24**, 414. 1949.

ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ, ВЛИЯЮЩИХ НА РАЗМНОЖЕНИЕ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК

К. Ваш

Научно-исследовательский институт Консервной-, Мясной-, и Холодильной Промышленности, Будапешт

Резюме

Измерения кинетики размножения клеток могут являться пригодными для изучения качественных и количественных условий как задерживающих так способствующих размножению микроорганизмов.

Такие воздействия нарушают обыкновенный ход размножения микробных культур. (I. рис.). Химические реагенты обыкновенно вызывают изменение фазы I (замедленная фаза) (L) и изменение темпа хода фазы (III) (экспоненциальная или логарифмическая фаза). Кроме этого обыкновенно изменяется и максимальное число зародышей (G) в V. фазе.

Нашими исследованиями, методом турбидиметрии (14), изучалось размножение культур *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *Torulopsis utilis* var. *maior*, *Bacillus Cereus* с известными исходными числами зародышей в питательных средах с разными концентрациями реагентов. При дегидроуксусной кислоте, бензойной кислоте, муравьиной кислоте, смеси эфиров

ономуксусных кислот (Пандурол (А) датское консервирующее средство) и цетилпиридинумбромид, из кривых размножения (наприм. рис. 2) графическим путем определен период замедленной фазы (L), а из экспоненциальных фаз вычислены генерационные сроки (T), а из последних, константы скорости размножения (K) час⁻¹ 207. ст.). Кроме этого определялись максимальные числа зародышей (G), устанавливаемые после длительного периода времени. При плеснях (*Asp. foetidus*) измерялся период задерживания (L) и скорость (K /мм/час) бокового распространения на агаре в чашке Петри (4 рис.).

Для характеристики задерживающего действия скорости размножения реагентами, указаны концентрации, уменьшающие на 50% константы скоростей размножения контрольных, безреагентных проб (m = доза среднего действия). Для вычисления этих концентраций применялся метод скользящей средней (2 таблица), распространенный в статистике и графического или численного интерполирования (Томсон (12) 203. стр.). Для подробной характеристики изменения константы K указаны числа, характеризующие угол падения кривой дозы-воздействия. Например: частное (Q) дозы, задерживающей размножение на 80 процентов (D_{80}) и дозы среднего действия ($m' = D_{50}$).

Важность ознакомления с углом падения кривой дозы-воздействия указана 9 и 10 рисунками. Тот реагент более ценный, у которого значение m и Q малое/например дегидроуксусная кислота (9 рис.) или реагент № 2 (10 рис.).

Результаты значений действия средних доз указаны в таблицах 1, 3, 4, и 5. — Значения K в зависимости от концентрации изображено на рис. 7.

Влияние на фазу замедления и на максимальное число зародышей видно из рисунков 5, 6 и 8.

Такое изучение кинетики размножения облегчает выяснить механизм действия реагентов (например соревнующиеся в угнетении: 11 рис. или 12 рис. 1 кривая; действие влияющее на замедленную фазу: 12 рис. 3 кривая). Исследованные реагенты оценены в смысле полученных результатов указанных на рис. 7. — Особенно подробно изучалось угнетение дегидроуксусной кислотой ферментов животных тканей и сопоставление результатов с литературными данными (Сиверс (11) дегидрогеназа янтарной кислоты), и какой механизм действия возможен в данном случае. (13 рис.) Установлено, что для *Bacillus* (13 рис. В линия), при pH 7, препятствие развития микроорганизмов по крайней мере частично связано с угнетением дегидрогеназы янтарной кислоты, а при *Saccharomyces* (С линия) и *Aspergillus* (Д линия) (pH = 4,75;) механизм угнетения не такого рода ввиду того, что угнетение размножения происходит дегидроуксусной кислотой в 100 раз меньшей концентрацией по сравнению с угнетением фермента. Для полного выяснения действия механизма естественно необходимо знать данные угнетения указанного фермента при меньших значениях pH.

Дозы среднего действия и концентрации полного угнетения отнесенные на кислоту или недиссоциированные молекулы (микробиологически действующие молекулы) (8, 9, 10, 15) сопоставлены в таблице 6.

Рис. 1.: Главнейшие фазы размножения бактерий и дрожжей. Ордината: логарифм числа зародышей, абсцисса: время.

Рис. 2.: Кривые размножения *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* в присутствии нескольких реагентов.

Цифры на кривых указывают концентрацию реагентов (мг/л). Ордината: логарифм числа зародышей, абсцисса: время/час. — Питательная среда: дрожжевая вытяжка (1+50) с пептоном (0,5%), сахарозой (1%) и буфером фосфата и цитрата, pH = 4,75. Исходное число зародышей: 1,8.10⁶/мл. Инкубационная температура: 31°C.

Рис. 3.: Определение дозы среднего действия методом скользящей средней и методом графического интерполирования при *Sacch. cerevisiae* и «Пандуроль».

Условия исследований: такие как и при таблице 2.
Ордината: константы скорости размножения (K) в процентах по контрольной пробе без реагентов, абсцисса: концентрация реагентов (мг/л). 1. Данные исследований. 2. Скользящая средняя.

Рис. 4.: Кривые размножения *Asp. foetidus* в присутствии нескольких реагентов. Цифры указывают на кривых концентрации реагентов (мг/л).

Условия исследований: питательная среда — дрожжевая вытяжка (1+50) с пептоном (0,5%), сахарозой (1%), буфером фосфата и цитрата, на агаре, pH = 4,25.

Инкубационная температура 31°C. Ордината: диаметр колонии (мм); абсцисса: время/час.

Рис. 5.: Влияние реагентов на замедленную фазу кривой размножения нескольких микробов.

Условия исследований *Saccharomyces*: 1, 2. рис.; *Torulopsis* 1., 3. табл. *Bacillus*: 1, 4. табл.; *Aspergillus* 1., 4. рис. — Ордината: замедленная фаза (L) в часах; абсцисса: концентрация реагентов, тонкие цифры: мг/л, толстые цифры: лог. мг/л.

Р и с. 6.: Влияние реагентов на максимальное число зародышей нескольких микроорганизмов.

Условия исследований: такие как и при рис. 5. — Ордината: максимальное число зародышей (G) в без реагентной контрольной пробе в процентах; абсцисса: концентрация реагента (мл/л.).

Р и с. 7.: Влияние реагентов на скорость размножения нескольких микроорганизмов. S : *saccharomyces*, T : *Torulopsis*, B : *Bacillus*, A : *Aspergillus*. Условия исследования как и при рис. 5. — Ордината: Константа скорости размножения (k) процент в безреагентной контрольной пробе; абсцисса: концентрация реагента (мл/г.).

Р и с. 8.: Влияние реагентов на замедленную фазу кривой размножения нескольких микроорганизмов S : *Saccharomyces*, T : *Torulopsis*, B : *Bacillus*, A : *Aspergillus*. Условия исследований: как и при рис. 5. — Ордината: замедленная фаза в часах (L); абсцисса: концентрация реагента (мл/л.).

Р и с. 9.: Разные действия муравьиной и дегидроуксусной кислот на скорость размножения *Bac. Cereus*. 1. натриевая соль дегидроуксусной кислоты. 2. натриевая соль муравьиной кислоты. Условия исследования: как и для таблицы 4. — Ордината: значения скользящей средней константы скорости размножения (процент в безреагентной контрольной пробе); абсцисса: концентрация реагента (мл/г.).

Р и с. 10.: Кривые действия разных доз.

Ордината: константа скорости размножения при угнетении (в процентах без реагентной контрольной пробы); абсцисса: концентрация реагента.

Р и с. 11.: Влияние изменения концентрации промежуточного метаболизма на активность фермента (по Гиншельвуд-у (4)): Ордината: активность фермента; абсцисса: концентрация промежуточного метаболита.

Р и с. 12.: Влияние разных типов реагентов на скорость размножения микроорганизмов (по Гиншельвуд-у (4)).

Ордината: константа скорости размножения; абсцисса: концентрация реагента.

Р и с. 13.: Угнетающее действие дегидроуксусной кислоты на дегидрогеназу янтарной кислоты и на некоторых микроорганизмов.

Ордината: Угнетающее действие (в процентах); абсцисса: логарифм концентрации (мол/л) дегидроуксусной кислоты. — A : угнетение дегидрогеназы янтарной кислоты при $pH = 7,4$ по Сиверс и сотруд. (11).

B : угнетение *Bacillus* при $pH = 7,0$ (1., 4. табл.)

C : угнетение *Saccharomyces* при $pH = 4,75$ (1., 1. табл.).

D : угнетение *Aspergillus* при $pH = 4,25$ (1, 5. табл.).

Таблица 1.: Влияние некоторых реагентов на скорость размножения *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*.

Условия исследований: как и для рис. 2. — (1) Наименование реагента, (2) Знак реагента, (3) концентрация реагента (мл/л), (4) K : константа скорости размножения; относительное значение, (5) m : доза среднего действия (мл/л), (6) в интервале концентраций между 160 и 320 мг/л более правильно может быть установлено значение m сериями исследований более меньших интервалов.

Таблица 2.: Определение дозы среднего действия скользящей средней. Значение константы (K) скорости размножения и скользящей средней при *Sacch. cerevisiae* var. *ellips.* в присутствии разных концентраций «Пандурол А» — Условия исследований: как и для рис. 2. — (1) концентрация (мл/л), (2) относительное значение, (3) скользящая средняя.

Таблица 3.: Влияние некоторых реагентов на скорость размножения *Torulopsis utilis* var. *maior*. Условия исследований: так как и для рис. 2, а исходное число зародышей: $3,3 \cdot 10^5$ /мл — (1) Наименование реагента, (2) знак реагента, (3) концентрация реагента, (4) K относительное значение, (5) m : доза среднего значения (мл/л.).

Таблица 4.: Влияние некоторых реагентов на скорость размножения *Bacillus cereus*. Питательная среда: вытяжка из зелёного горошка (1+25) с пептоном (0,5%), сахарозой (0,2%), фосфатом ($n/15$), при $pH = 7,00$. — Исходное число зародышей: $5,4 \cdot 10^5$ — Инкубационная температура: $31^\circ C$ — (1) Наименование реагента, (2) знак реагента (3) концентрация реагента, (4) K : относительное значение, (5) m : доза среднего действия (мл/л.).

Таблица 5.: Влияние нескольких реагентов на скорость размножения *Aspergillus foetidus* Условия исследований: такие как и для рис. 4. — (1) наименование реагента, (2) знак реагента, (3) концентрация реагента (мл/л), (4) константа скорости размножения (мм/час), (5) относительное значение, (6) m : доза среднего действия (мл/л.).

Таблица 6. Данные дозы среднего действия реагентов и данные полного угнетения для нескольких микроорганизмов.

(1) микроорганизм, (2) исходное число зародышей (клеток/мл), (3) доза реагента (мл/г) (4) при слабых кислотах перечисленная на кислоту, (5) перечисленная на не диссоциированное соединение, (6) Косо стоящие цифры: доза среднего действия, (7) прямо стоящие цифры: «полное» угнетение.

Kinetic Examination of Factors Affecting Growth of Microbial Populations

K. VAS

Institute for Research in Canning, Meat Packing and Refrigeration, Budapest

Summary

Qualitative and quantitative relationships of factors promoting or hindering the growth of microorganism can effectively be studied by kinetic measurements.

The above factors interfere with the normal course of growth of microorganisms (Fig. 1). Changes are usually introduced into the duration (L) of phase I (lag phase), and into the rate of growth in phase III (exponential or logarithmic phase). Ordinarily, changes in the maximum number of cells (total growth, G) in phase V (stationary phase) also occur.

In the present experiments the growth of *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *Torulopsis utilis* var. *maior* and *Bacillus cereus* was studied turbidimetrically (14) in culture media containing various chemicals. By plotting the growth curves measured in the presence of varying concentrations of dehydroacetic acid (DHE), benzoic acid (BEN), formic acid (HAN) or of their sodium salts (DHE-Na, BEN-Na, HAN-Na), of a mixture of esters of bromoacetic acid (the Danish preservative »Panduror A»: PAN) and of cetylpyridiniumbromide (CPB) (Fig. 2), the duration (L) of the lag phase and the length of the generation time (T) were determined graphically. From the latter the growth rate constant (k , hour⁻¹) was calculated (p. 207.). Finally, total growth (G) was measured after longer periods of cultivation. — In the case of moulds (*Asp. foetidus*) the lag (L) and rate (k , mm/hour) of lateral growth were determined (Fig. 4).

In order to characterise the effect of chemicals on the growth rate, concentrations (m : medium effective dose) necessary to reduce k by 50% of the original value were calculated by applying the wellknown method of moving averages (Table 2) and interpolating graphically (Fig. 3) or algebraically [Thompson (12); p 208.]. As an additional characteristic of the effect of the chemical on k , an expression denoting the slope of the dosage-response curve, e. g. the quotient (Q) of the doses giving 80% (D_{80}) and 50% ($D_{50} = m$) inhibition, respectively, is calculated. — The importance of knowing the slope of dosage response curves is illustrated in Figs. 9 and 10. A chemical is more effective than the others tested simultaneously if its m and/or Q values are smaller than those of the others [e. g. dehydroacetic acid (Fig. 9), or Chemical No. 2. in the graphical example of Fig. 10].

Values obtained for the medium effective dose are given in Tables 1, 3, 4, and 5. In Fig. 7 k values are plotted as functions of the concentration of the chemical.

The effects on lag phase and total growth may be seen from Figs. 5, 6, and 8.

Studies on the kinetics of growth of microbial populations make it possible to gain insight into the mechanism of action of agents affecting the life of microbial cells (e. g. competitive inhibition: Fig. 11, Fig. 12, Curve 1; action limited to the lag phase: Fig. 12, Curve 3.). Using the data in Fig. 7, it was attempted to evaluate the applied chemicals from this point of view. — A special study was devoted to find out what mechanism of action can be postulated for dehydroacetic acid from a comparison of the present results and of data found in the literature [Seevers et al. (11)] concerning the inhibition of animal tissue enzymes (succinic dehydrogenase). It was found (Fig. 13) that while hindrance of growth of *Bacillus* (Fig. 13. Curve B) at pH = 7.0 may depend, partly at least, upon the action of DHE on succinic dehydrogenase, in the case of *Saccharomyces* (Curve C) or *Aspergillus* (Curve D) this cannot be supposed: growth of these organism (at pH 4.75, and 4.25) was already prevented by DHE concentrations about 100 times lower than that necessary to inhibit succinic dehydrogenase (in rat tissues at pH = 7.4 Curve A). A complete picture of the situation could only be obtained if inhibition data would be available for the above enzyme at lower pH values.

From data of the experiments reported herein the concentrations giving 50% and »complete» inhibition were calculated on the acid basis and on the basis of the undissociated [i. e. microbiologically active (8, 9, 10, 15)] compound, respectively (Table 6).

Fig. 1. Main Phases of Growth of Bacterial and Yeast Cultures. — Ordinate: logarithm of cell numbers. Abscissa: time.

Fig. 2. Growth Curves of *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* in Presence of Certain Chemicals. — Figures on the curves indicate the concentration of the chemical. (mg/l). — Ordinate: log cill count. Abscissa: time (hours). — Medium: yeast decoction (1 + 50) containing peptone (0.5%), sucrose (1%) and phosphate-citrate buffer (McIlvaine) pH = 4.75. Initial viable count: $1.8 \cdot 10^5$ /ml. Incubation: 31° C.

Fig. 3. Determination of the Medium Effective Dose from Moving Averages by Graphical Interpolation in the Case of *Sacch. cerevisiae* and »Panduro A«. — Experimental conditions : as in Table 2. — Ordinate : Growth rate constant (k) as percent of that of the control containing no chemical. Abscissa : concentration of preservative (mg/l). Curve 1 : experimental data, Curve 2 : moving averages.

Fig. 4. Growth Curves of *Asp. foetidus* in Presence of Certain Chemicals. — Figures on the curves indicate the concentration of the chemical (mg/l). — Medium : yeast decoction (1 + 50) containing peptone (0,5%), sucrose (1%), phosphate-citrate buffer and 5% of agar. pH = 4,25. Incubation 31° C. — Ordinate : diameter of the colony (mm). Abscissa : time (hours).

Fig. 5. The Effect of Chemicals on the Lag Phase of Certain Microorganism. — Experimental conditions : *Saccharomyces* : see Fig. 2. *Torulopsis* : see Table 3.; *Bacillus* : see Table 4.; *Aspergillus* : see Fig. 4. — Ordinate : duration of lag (hours). Abscissa : log concentration of chemical (mg/l).

Fig. 6. The Effect of Chemicals on Total Growth of Certain Microorganism. — Experimental conditions : as in Fig. 5. — Ordinate : total growth (G) in percent of the control not containing chemicals. Abscissa : concentration of chemical (mg/l).

Fig. 7. The Effect of Chemicals on the Growth Rate of Certain Microorganism. — Experimental conditions : as in Fig. 5. — Ordinate : growth rate constant (k) as percent of k measured in the control not containing chemicals. Abscissa : concentration of chemical (mg/l).

Fig. 8. The Effect of Chemicals on the Lag Phase of Certain Microorganisms. — Experimental conditions : as in Fig. 5. — Ordinate : length of lag (L) in hours. Abscissa : concentration of chemical (mg/l).

Fig. 9. Different Actions of Formic and Dehydroacetic Acids on the Growth Rate of *Bacillus cereus*. — Curve 1 : sodium salt of dehydroacetic acid, Curve 2 : sodium formate. — Experimental conditions as in Table 4. — Ordinate : moving averages of the growth rate constants (in percent of the control not containing chemicals). Abscissa : concentration of chemical (mg/l).

Fig. 10. Various Dosage-Response Curves. — Ordinate : inhibition (in percent as compared with the control) of the growth rate constant. Abscissa : concentration of chemical.

Fig. 11. The Effect of the Concentration of Intermediate Metabolite on the Activity of Enzymes [After H i n s h e l w o o d (4)]. — Ordinate : enzyme activity. Abscissa : concentration of intermediate.

Fig. 12. Various Types of Chemical Effects on the Growth Rate of Microorganisms [After H i n s h e l w o o d (4)]. — Ordinate : growth rate constant. Abscissa : concentration of chemical.

Fig. 13. Comparison of the Action of Dehydroacetic Acid on Succinic Dehydrogenase and on the Growth of Certain Microorganism. — Ordinate : inhibition (%). Abscissa : logarithm of concentration (mole per litre) of dehydroacetic acid. — Curve A : inhibition of dehydroacetic acid at pH 7,4 according to S e e v e r s and collaborators (11). Curve B : inhibition of the growth of *Bacillus* at pH = 7,0 (see Table 4.). Curve C : inhibition of *Saccharomyces* at pH 4,75 (see Table 1). Curve D : inhibition of *Aspergillus* at pH 4,25 (see Table 5.).

Table 1. Effect of Certain Chemicals on the Growth Rate of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. — Experimental conditions as in Fig. 2. — (1) chemical, (2) notation (3) concentration (mg/l), (4) growth rate constant (k), relative values (5), medium effective dose (m ; mg/l), (6) to get a more reliable value of m , a new, more finely graded experiment should be performed in the range 160 to 320 mg/l.

Table 2. Determination of the Medium Effective Dose Using the Method of Moving Averages. — The value of growth rate constants (k) and their moving averages in the case of *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* at various concentrations of »Panduro A«. — Experimental conditions : as in Fig. 2. — (1) concentration (mg/l), (2) relative value, (3) moving average.

Table 3. Effect of Certain Chemicals on the Growth Rate of *Torulopsis utilis* var. *maior*. — Experimental conditions : as in Fig. 2. Except that here the initial count was $3,3 \cdot 10^5$ /ml. — (1) chemical, (2) notation, (3) concentration (mg/l), (4) growth rate constant (k), relative value, (5) medium effective dose (m ; mg/l).

Table 4. Effect of Certain Chemicals on the Growth Rate of *Bacillus cereus*. — Medium : pea extract (1 + 25) containing peptone (0,5%), sucrose (0,2%) and phosphate buffer (M/15); pH = 7,00. Initial count : $5,4 \cdot 10^5$ /ml. Incubation : 31° C. — (1) chemical, (2) notation, (3) concentration, (4) growth rate constant (k), relative value, (5) medium effective dose (m ; mg/l).

Table 5. Effect of Certain Chemicals on the Growth Rate of *Aspergillus foetidus*. — Experimental conditions : as in Fig. 4. — (1) chemical, (2) notation, (3) concentration (mg/l), (4) growth rate constant (mm/hour), (5) relative value, (6) medium effective dose (m ; mg/l).

Table 6. Doses Giving 50% and »Complete« Inhibition of Certain Microorganisms. — (1) Microorganism, (2) initial count (cells/ml), (3) required amount of chemical (mg/l), (4) on acid basis (in the case of weak acids), (5). undissociated. — Figures in italics : medium effective doses, figures in Roman type : »complete« inhibition.